ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

Г. В. Борончук, И. В. Балан, Н. В. Рошка, Ю. М. Казакова, М. Г. Букарчук
Институт физиологии и санокреатологии АН Молдовы,

ПРИМЕНЕНИЕ ВЕЩЕСТВ РАЗЛИЧНОЙ ПОЛЯРНОСТИ В СОСТАВЕ СРЕД ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГЕНОМОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Повышение результативности криоконсервации генома животных, возможно путем совершенствования криозащитных сред и применения эффективных технологических приемов. Однако они могут быть разработаны на основе экспериментальных исследований, выполненных на различных уровнях организации биологических объектов с использованием веществ отличающихся механизмом их действия. В связи с этим, целью представленной работы было изучение влияния веществ различной полярности на морфофизиологические показатели деконсервированных гамет быка и петуха.

Материал и методы исследований

Объектом исследования служило семя быков черно-пестрой и петухов Род-Айрландской пород. Оптимальный состав и концентрацию компонентов криозащитных сред при замораживании геномов животных определяли путем смешивания изотонических растворов исследуемых веществ по арифметическому или геометрическому ряду по В.К. Милованову [4].

Качество семени определяли по физиологическим показателям – подвижности, продолжительности жизни, абсолютному показателю выживаемости гамет [4]. Морфологические изменения гамет изучали путем оценки состояния их акросом с использованием фазоконтрастной микроскопии.

Результаты и их обсуждение

Стабилизация функциональной полноценности генома животных является одной из важнейших криобиологических проблем. Одним из перспективных подходов в данном направлении, представляется введение в состав сред таких компонентов, которые обеспечивали бы возможность образования новых биокомплексов между компонентами мембран и синтетических сред. В этом плане было изучено влияние аминокислот, относящихся к различным группам, на показатели оттаянного семени петуха (табл. 1).

Данные показывают, что после замораживания семени петуха в средах, содержащих испытуемые аминокислоты, подвижность гамет колеблется в пределах 3,8±0,13 – 4,6±0,11 баллов. Наиболее высокий исследуемый показатель – при использовании аргинина и валина, Следовательно, эти аминокислоты могут быть использованы для стабилизации межмолекулярных взаимодействий при криоконсервации семени петуха.

Высокая эффективность аргинина при криоконсервации гамет петуха согласуется с данными В.А. Наука [5], проводившего опыты с гаметами быков и может быть объяснена тем, что в физиологичес-

Таблица 1

Влияние аминокислот на качество деконсервированного семени петуха, n=5

Аминокислоты (АК)	Подвижность оттаянных гамет, балл
Аланин	3,8±0,136
Аргинин	4,4±0,119*
Аспарагиновая кислота	3,9±0,209
Валин	4,6±0,112*
Среда без АК (контроль)	3,9±0,111

*Различия статистически достоверны

ком интервале рН 6-8 боковые цепи аргинина заряжены положительно. В случае пространственной сближенности положительно (аргинин) и отрицательно (поверхность гамет) заряженные группы, благодаря электростатическому притяжению через ионную связь образуют комплексы между компонентами поверхностных мембран и аргинином, что положительно сказывается сохранение физиологических показателей гамет после оттаивания.

Относительно валина, согласно данным С.А. Шерман и др. [7], его крупные неполярные остатки спрятаны в глубине белковой глобулы. При том, боковые группы этих остатков являются гидрофобными, что препятствует взаимодействию валина с водой и образованию крупных кристаллических структур льда, которые могли бы привести к механическому повреждению криоконсервируемых объектов.

Учитывая исключительную роль биокомплексов в функционировании биологических мембран [2] в проведенных опытах изучено влияние моносахаров, являющихся основными компонентами гликоконьюгатов мембран (глюкоза входит в состав гликолипидов и гликопротеидов, ксилоза – в состав протеогликанов, маноза – в состав гликопротеидов, галактоза – в состав гликопротеидов, протеогликанов и гликолипидов) [1]. На физиологические показатели криоконсервированного семени быка (табл. 2).

Из представленных данных следует, что наиболее ярко выраженная стабилизация подвижности гамет после оттаивания, продолжительности их жизни и абсолютного показателя выживаемости была достигнута в случае использования среды на основе глюкозы. Включение данного препарата в состав среды для разбавления и замораживания семени быка позволило достичь статистически достоверной разницы между изучаемыми показателями при применении аналогичных сред на основе ксилозы, манозы и галактозы. Более ярко выражены эти изменения в подвижности и абсолютным показателе выживаемости гамет. Следовательно, не все моносахара обладают одинаковыми криозащитными свойствами.

Повышение физиологических показателей после деконсервации гамет быка, сохраненных под защитой глюкозы, обусловлено тем, что она является мощным осмотическим стабилизатором [3]. По мнению О.В. Мельниковой [3] механизм действия указанного моносахара, по-видимому, реализуется через изменение состояния цитоплазматических компонентов клетки, повышая тем самым ее сохранность после низкотемпературного воздействия.

Полученные данные показывают, что повышение устойчивости гамет к неблагоприятным условиям криоконсервации во многом зависит от стабилизации надмолекулярных структур (гликолипидов

Таблица 2

Результативность моносахаридов при криоконсервации семени быка, n=5

Наименование углеводов	Подвижность оттаянных гамет, балл	Продолжительность жизни оттаянных гамет, час	АПВ, у.е.
Глюкоза (контр.)	3,9±0,19	5,6±0,26	14,1±1,58
Ксилоза	1,7±0,37*	4,4±0,34*	5,7±1,13*
Маноза	2,6±0,19*	5,4±0,60	8,6±1,08*
Галактоза	1,7±0,34*	4,4±0,68	5,5±0,85*

*Различия статистически достоверны

Таблица 3

Эффективность применения моно-, ди- и трисахаридов при криоконсервации семени быка, n=5

Кол-во гликозидных остатков	Наименование углеводов	Показатели оттаянного семени:			
		Подвижность, балл	Выживаемость, час	АПВ, у.е.	Кол-во интактных акросом, %
1	Галактоза	2,0±0,34	4,5±0,73	3,9±1,63	29,0±6,42
2	Лактоза	3,3±0,34	7,5±0,55	11,7±0,60	27,0±6,28
2	Мальтоза	3,8±0,27	6,8±0,73	11,2±1,40*	27,5±6,31
2	Сахароза	4,0±0,28	9,7±0,83*	16,4±1,90	38,5±6,88
3	Раффиноза	4,0±0,31	8,7±0,67	16,4±1,62	30,0±6,48

*Различия достоверны по сравнению с моносахаридом

и гликопротеидов).

Одной из основных структурных особенностей углеводов является наличие гликозидных связей. При этом количество гдикозидных остатков углеводов может определить их криопротекторный эффект. Поэтому, в следующей серии опытов была определена эффективность моно-, ди- и трисахаридов в случае консервации семени быка (табл. 3).

Полученные результаты убеждают в том, что ди- и трисахара более эффективны при замораживании семени быка в сравнении с моноуглеводами.

В данном опыте кроме физиологических показателей семени быка было изучено морфологическое состояние акросом после оттаивания исследуемого объекта. Важность исследования состояния акросомного аппарата обусловлена тем, что акросома являясь значительно оводненным гликопротеидным, гидрофильным легко набухающим и растворимым в воде комплексом [9] может быть уязвимой в результате действия экстремальных факторов на различных технологических этапах. Прежде всего, повышенное содержание воды указывает на повышенный отрицательный, поверхностный заряд акросомальных мембран.

Из результатов таблицы 3 следует, что наилучшие показатели по сохранению акросом гамет быка получены в случае применения сахарозы. Видимо, этот углевод способен нейтрализовать отрицательный заряд акросом, создавая тем самым оптимальные условия для сохранения морфологических структур гамет быка.

Из данных таблицы 3 также следует, что на качество оттаянного семени петуха влияет не только количество моносахаридных остатков в молекуле углевода, а и особенности физиолого-биохимической и физической ситуации, складывающейся в криобиологической системе в процессе консервации геномов сельскохозяйственных животных.

Учитывая тот факт, что репродуктивные клетки различных видов животных отличаются вариабельностью физиологических и биохимических показателей [8], а, следовательно, и различной устойчивостью к температурному стрессу [6], аналогичные следования были проведены на семени петуха (табл. 4).

Из данных таблицы следует, что лучшие результаты по восстановлению функциональной активности семени петуха после консервации получены при использовании мальтозы. Лактоза и раффиноза на этот раз оказались малоэффективными, следовательно, при подборе углеводов недостаточно информации о количестве гликозидных остатков в молекуле углевода. Необходимо располагать многогранной информацией о подбираемом компоненте.

Таким образом, углеводы могут быть

Таблица 4

Влияние моно-, ди- и трисахаридов на качество семени петуха, n=5

Кол-во гликозидных остатков	Наименование углеводов	Подвижность гамет (балл), после:	
		разбавления	оттаивания
1	Глюкоза	7,1±0,09	4,9±0,19
2	Сахароза	7,1±0,44	4,5±0,22
2	Лактоза	6,0±0,35	4,6±0,20
2	Мальтоза	7,8±0,22	5,8±0,12*
3	Раффиноза	6,7±0,22	4,6±0,24

*Различия достоверны по сравнению с моносахаридом

использованы в качестве эффективных компонентов сред, однако в каждом конкретном случае необходимо подбирать оптимальные варианты.

Выводы

1. Полярность ингредиентов синтетических сред оказывает существенное влияние на криобиологические показатели сохраненных объектов вследствие межмолекулярного взаимодействия их через ионные связи, с элементами цитоплазматических мембран.

2. Способность аминокислот образовывать биокомплексы или препятствовать образованию крупных кристаллов льда повышает эффективность криоконсервации геномов животных.

3. Механизмы криопротекторного эффекта полярных соединений могут реализовываться путем становления межмолекулярных взаимодействий в криобиологических системах.

4. При создание новых криоконсервантов необходимо учитывать их физико-химические свойства и видоспецифичность консервируемого материала.

SUMMARY

In the experiment it was studied the role of substances with different polarity (glucides and amino acids) at the cryopreservation of bull's semen and of cock's semen. It was established the factors which depend on their influence of the gametes of experimental animals. The researchers tried to explain the mechanisms of the cryoprotective activity in a new way. It was summed up that the glucide was well studied monosaharid in the cryopreservation process of bull's semen which has the property to stabilize the intermolecular interactions as in the glycolipids complexes as in those glycoproteinic. At the same time with the increase of the content's monomerycal links the morphophysiologycal indices of deconservated material also increase. The performed experiments established that the cryoconservative result of the substances with the different polarity was able to understand proceeding from the changes of superficial load of the plasmatic membranes of gametes.

Литература

1. Болдырев А.А. Введение в мембранологию. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
2. Борончук Г.В., Балан И.В. Криомембранология. Кишинев, АНМ, 2003. 336 с.
3. Мельникова О.В., Бондаренко Т.П. Модифицирующее действие глюкозы на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу // Физ.-хим. процессы в криобиологических системах. Харьков, 1991. С. 68-78.
4. Милованов В.К. Биология воспроизведения и исскуственное осеменение животных. М.: Изд-во с-х литературы и плакатов, 1962. 696 с.
5. Наук В.А. Структура и функция спермиев с-х животных при криоконсервации. -Кишинев: Штиинца, 1991. 200 с.
6. Фурдуй Ф.И., Чокинэ В.К., Вуду Г.А. и др. Гаметогенез как начальный этап закладки генетических основ здоровья // Известия АНМ, 2002. № 4. С. 30-39.
7. Шерман С.А. и др. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. Минск: Наука и техника, 1989. 239 с.
8. Balan I., Boronciuc Gh. Modificările lipidelor membranice în ciclul congelarea decongelarea spermei animalelor agricole // Luc. şt.: UASM, 2005. Vol.13. P. 215-218.
9. Nicolov I., Nestorova J., Hristov M. et al. Investigation of the semenogram and morphological changes of he-goat spermatozoa during equilibration // Macedonian Joarnal of reproduction, 1996. Vol. 2. № 1. P. 75-78.

УДК: 576/57.086.862+57.086.864+57.086.866

В.А. Никитин, А.С. Соболев

Институт биофизики клетки РАН (ИБК РАН), Институт биологии гена РАН (ИБГ РАН)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И СОМАТИЧЕСКОГО КЛОНИРОВАНИЯ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ И ВОСПРОИЗВОДСТВА ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Главная тема настоящих исследований – реконструкция единичной клетки, фундаментальные и технологические аспекты проблемы клонирования. Эти работы находятся в русле научного направления по сохранению исчезающих видов животных, создателем которого в нашей стране был профессор Б.Н. Вепринцев.

Сохранение исчезающих видов животных осуществляется различными метода-